Aus dem Laboratorium f. Übermikroskopie der Siemens & Halske AG Berlin
und der I. Medizinischen Universitätsklinik der Charité Berlin
Direktor: Prof. Dr. Siebeck

Übermikroskopische Untersuchungen über die Membran und Kapsel der Bakterien

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

vorgelegt von

ECKEHARD FRÜHBRODT

aus Fahrenwalde Kr. Prenzlau

Tag der Promotion: 2. November 1940

Buchdruckerei Franz Linke, Berlin NW 7, Marienstr. 13

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. Kreuz
Referent: Prof. Dr. Siebeck

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I. Aufgabenstellung und Literatur.

Die bisherigen lichtoptischen Untersuchungen an Bakterien führten zu keiner einheitlichen Anschauung über die Struktur der Bakterienmembran und der Kapsel. Dies war zum großen Teil durch das begrenzte optische Auflösungsvermögen des Lichtmikroskopes bedingt. Auch die Färbemethoden, auf deren Anwendung sich die lichtoptischen Befunde stützen mußten, führten oftmals zu Kunstprodukten und erschwerten so die Beurteilung der Untersuchungsergebnisse. Es war daher naheliegend, die lichtoptischen Befunde an Hand der übermikroskopischen Untersuchungsmethode nachzuprüfen bzw. zu erweitern.

Die Möglichkeit, sublichtmikroskopische Strukturen an Bakterien abzubilden, wurde bereits in früheren Mitteilungen gezeigt. Insbesondere konnte die Frage der Nucleoide (Piekarski) untersucht und festgestellt werden, daß in der Massenverteilung der Zelle Gebilde zu finden sind, die in Uebereinstimmung mit spezifischen lichtoptischen Untersuchungsergebnissen als Kernaequivalente anzusprechen sind (G. Piekarski und H. Ruska (33). Die Nucleoide fanden sich auch an anderen Bakterienstämmen immer wieder, und es gelang Kulturbedingungen auszuarbeiten, unter denen sie besonders leicht zur Darstellung kommen. Da sie aber nicht in jedem Zellzustand — wenigstens elektronenoptisch — als besondere Zentren sichtbar sind, muß man annehmen, daß erst eine Entmischung zu den wohlgeformten Körperchen der Nucleoide führt (vgl. auch K. Pietschmann und A. Rippel (34)). An Tuberkelbazillen konnten neuerdings Bilder gewonnen werden, die wohl solche Stadien der Entmischung darstellen (A. Lembke, H. Ruska und J. Christophersen (24)).

Mit dem Nachweis der Nucleoide war ein Schritt zu einer zytologischen Differenzierung der Bakterienzelle getan, der über die von Zettnow gegebene Unterscheidung von Entoplasma und Ektoplasma hinausging und sich bezüglich der Lokalisation der Träger des Vererbungsvor-

ganges mehr einer Gliederung in Kern und Protoplasma nähert, wie sie andere pflanzliche Zellen aufweisen. Ein Entoplasma im Sinne Zettnows, als Mischung von Kernsubstanz und Protoplasma, liegt in jenen Zellen vor, welchen eine morphologische Scheidung der thymonucleinsäurehaltigen Kernsubstanzen fehlt.

Von Differenzierungen des Ektoplasmas wurden vor den Ergebnissen über die Nucleoide bereits die Geißeln dargestellt (32). Die vorliegende Mitteilung soll über Versuche mit Kapselbakterien berichten und sich mit den Beziehungen der Kapsel zum Ektoplasma und zur Bakterienmembran, sowie ihrer Struktur befassen.

In der umfangreichen Literatur auf Grund lichtoptischer Untersuchungen findet man folgende Anschauungen über diesen Gegenstand.

Nach den auch heute noch nicht als widerlegt geltenden (T. Wohlfeil 43) Ausführungen von Zettnow (45) unterscheiden wir am Bakterium eine färberisch darstellbare Kernsubstanz (Chromatin) in Mischung mit Protoplasma, das Entoplasma und eine nur durch besondere Präparationsmethoden sichtbar werdende äußere Hülle aus einem modifizierten, dichteren Protoplasma, das Ektoplasma. Dieses Ektoplasma ist entweder als Hülle (nicht Kapsel) oder auch in Form von Geißeln ausgebildet. Bei einzelnen Proteusarten schätzt Zettnow die Menge des Ektoplasmas mindestens auf die Hälfte des ganzen Zellleibes. Es soll eine wasserärmere und damit konzentriertere Substanz sein, die auch größere Widerstandsfähigkeit gegenüber Färbungen, Plasmolyse usw. besitzt. Das Zurückweichen des Innenkörpers von dem Ektoplasma bei der Plasmolyse sei durch eine genügend feste innere Begrenzungsschicht des Ektoplasmas auf Grund seiner chemischen Differenzierung ermöglicht. Schaudinn (40) hat beim riesigen Bac. Bütschlii diese Grenzschicht als besondere, doppelt konturierte Zellmembran gefunden, die nach außen direkt in die ektoplasmatische Hülle übergeht. A. Meyer (25) gelang bei kleineren Bakterien die Darstellung eines äußeren Zellhäutchens durch Färbemethoden. Im übrigen scheint die Ausbildung einer Membran und einer sie bedeckenden Schleimschicht bei verschiedenen Bakterien sehr verschieden sein. Heim (18) konnte die Membran am Bac. cyanogenes als feine Kontur nachweisen. Kruse (23) fand das Auftreten sogenannter „Schatten", d. h. leerer, scharfkonturierter Zellen in absterbenden Kulturen für eine Membran charakteristisch, aus der das Protoplasma ausgetreten war. Emmerich und Saida (11)

brachten bei Milzbrandbazillen, die durch Pyocyanase aufgequollen waren, und Pane (31) bei der Autolyse in der Kälte Membranen zur Darstellung. Gutstein (16) zeigte durch Beizungs- und Färbeverfahren die isolierte Darstellung oder Kontrastdarstellung des Ektoplasmas. Nach Gotschlich (15) ist auch das Ektoplasma der Träger der Gramfestigkeit. Nach Nakanishi (28) ist bei Milzbrandbazillen und Staphylokokken die Membran besonders stark ausgebildet. Bei Tuberkelbazillen besteht sie aus ganz besonders widerstandsfähigem Material und enthält Fett und wachsartige Substanzen eingelagert (Babes (2), Knoll (22), Bergel (5)). (Vergl. damit jedoch die Arbeit von Lembke, Ruska und Christophersen (24)).

Bei einzelnen Bakterien treten deutliche, nur mit besonderen Verfahren färbbare, außerhalb der Membran liegende Kapseln auf. Binaghi (6) sieht in der Kapsel das Produkt einer biochemischen Tätigkeit des Bakteriums und glaubt, daß sie durch Anschwellen seiner äußeren Schichten entsteht. Auch nach Gotschlich (15), der wie einige Autoren die Membran mit dem Ektoplasma weitgehend identifiziert, ist die Kapsel durch Aufquellung des Ektoplasmas entstanden und sogar bei allen Bakterien vorhanden. Wenn sie bei bestimmten Arten quantitativ stärker hervortritt, insbesondere im infizierten Organismus bei den sogenannten Kapselbakterien, so ist dies als Schutzmaßnahme gegen die bakterienfeindlichen, zerstörenden Einflüsse (Alexine, Plakine, Leucine) zu erklären; denn es geht mit dieser aktiven Reaktion eine Steigerung der Virulenz und Serumfestigeit einher (Bakterienimmunität durch strukturelle Anpassung, Sauerbeck (39)). Außerhalb des Tierkörpers kann die Kapselbildung durch Immunserum, hohen Zuckergehalt, Arsenik usw. als Zusätze für Nährböden angeregt werden. Kapseln wurden nachgewiesen von Noetzel (29) an Staphylo- und Streptokokken mit verdünnter Kalilauge; von Babes (1) am Typhuserreger durch Löfflers Geißelfärbung; durch Zettnow (46) am Pestbazillus; von Bunge (10) bei Coli, Typhus und Proteus; von Unna (42) bei den Tuberkel- und Leprabazillen als rote Hüllen mit Kernresten, von Jone (21) und vielen anderen beim Milzbrand. Mit der Frage der Milzbrandkapsel befaßten sich besonders eingehend A. Fischer (13) und auf Anregung von v. Baumgarten W. Enderle (12), auf deren Auffassungen noch zurückzukommen ist.

Fürst (14), Heim (19), Toeniessen (41) unterscheiden an der Kapsel zwei Schichten: die innere lebenswichtigere als Ektoplasmaanteil und die äußere als diffuses Sekretionsprodukt ohne eine scharfe äußere Kapselmem-

bran. Nach Bail (3) erfolgt der Uebergang des Bakteriums in die Kapselschicht fließend, d. h. ohne Membran, während Woloschin (44) an Hand der Beobachtung von Leerkapseln eine innere scharfe Begrenzung hervorhebt. Baumgärtel (4) behauptet die Anwesenheit einer stark lichtbrechenden Zellhaut. Nach Bail (3) ist die Grenze der Kapseln gegen die Umgebung im lebenden Zustande der Bazillen immer eine scharfe; Fortsätze oder amöboide Auswüchse lassen sich nicht beobachten. Er findet im gefärbten Präparat bei langer Färbung mit verdünnten Lösungen keine äußere Grenzmembran, wohl aber bei brüsker Färbung. Bei Bakterien in eiweißhaltigen Flüssigkeiten findet er unter anderem auch Kapseln mit pseudopodienartigen, spitzen Fortsätzen versehen, hält diese aber für Kunstprodukte.

Fürst (14) unterscheidet die Kapseln als einen aus dem Zellplasma differenzierten Bakterienanteil und außerdem eine Hülle aus umgebendem Nährmedium, die aus radiär gestellten feinsten Körnchen bestehen soll. Die Kohäsion ist zwischen beiden so stark, daß ein mehrmaliges Waschen in physiologischer Kochsalzlösung ohne Schaden vertragen wird. Woloschin (44) behauptet, eine radiäre Streifung nachgewiesen zu haben. Ottolenghi (30) sah eine Netzstruktur, die er aber für eine unregelmäßige, künstliche Aufquellung des Ektoplasmas hält. Babes (1) findet beim Friedländerbakterium eine konzentrische Schichtung der Kapsel. Hinterberger (20) sah auf Grund versilberter Präparate radiäre Faltungen und geißelartige Fortsätze. Radiäre oder ungefähr radiäre Streifungen bildet auch Toenniessen (41) ab. Ottolenghi (30) fand bei Safraninfärbung ebenfalls radiäre Lagerung. Woloschin (44) bildet außerdem unregelmäßige, grobe Wabennetze ab und sieht innerhalb der Kapseln sogar Vorstufen der Sporenbildung, wie auch diese als eine Art Sporangium und die innerhalb der Kapsel vorkommenden Zerfallsprodukte des Entoplasmas als färbbare Sporen oder deren Auskeimungen betrachtet werden. Hinterberger (20) beschrieb in der Interzellularsubstanz eine ganz feine netzartige Struktur, die in der Nähe der Bakterienleiber Aehnlichkeit mit Geißelbildungen hat. Migula (26) hat Schleimfäden beobachtet, die von der quellenden Membran ausgehen. Ebenso konnten Hinterberger (20) und Hamm (17) bei gewissen Manipulationen Schleimfäden und Pseudogeißeln am Rande der Kapseln erhalten. Die Kapsel hat nach ihrer Meinung außen keine scharfe Grenzmembran.

Wie hieraus ersichtlich ist, haben die vielen lichtoptischen Untersuchungen kein einheitliches Ergebnis gezeigt. Auch heute noch erscheint manchen Autoren die Existenz einer Membran nicht mit Sicherheit erwiesen (R. Müller (27)). Wesen und Zugehörigkeit der Kapsel wird verschieden betrachtet, ihr Vorkommen, ihre Struktur, ihre innere und äußere Begrenzung werden verschieden beschrieben.

II. Material und Voruntersuchungen.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden als typische Vertreter kapselbildender Bakterien verschiedene Stämme von

Streptococcus lanceolatus, Typ I, II, III
Bacterium pneumoniae und
Bacillus anthracis

herangezogen.

Als Nährböden dienten Nährbouillon, Agar und Blutagar, für die Tierversuche weiße Mäuse, die ich meist intraperitoneal infizierte. Bei den aus Tierversuchen zur Gewinnung von Kapseln isolierten Bakterien wurde bakterienhaltiges Peritonealexsudat oder Blut sorgfältig in destilliertem Wasser zentrifugiert, bis die Bakterien von Salzen, Eiweiß, Blut- und Exsudatzellen befreit waren. Ebenso wurde mit Keimen aus Bouillon verfahren. Die Beobachtungen und Abbildungen der Präparate erfolgte lichtoptisch an ungefärbten Präparaten, nach Färbung mit Fuchsin, unter Anwendung der Kapselfärbung nach Jone und im Tusche- bzw. Kollargolpräparat. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit dem Siemens-Uebermikroskop nach E. Ruska und B. v. Borries (9) angefertigt, wobei daran erinnert sei, daß die übermikroskopischen Bilder die Massenverteilung im Objekt wiedergeben (8). Die Kulturbakterien wurden in der früher beschriebenen Weise aus wässrigen Suspensionen auf Zaponlackfilmen aufgetrocknet (35, 33), die Bakterien aus dem Tierkörper nach der Reinigung. Welche Untersuchungsverfahren bei der Uebermikroskopie in Frage kommen, wurde an anderer Stelle ausführlich dargestellt (37). Die Bilder sind in Originalgröße reproduziert.

Zur Kritik dieser Methoden sei betont, daß die elektronenoptische Untersuchung der Bakterien ohne Färbung

erfolgt. Dadurch entfallen Anlagerungen von Farbteilchen an der Baterienoberfläche, die zu Täuschungen über die Außenkontur führen können. Andererseits kann möglicherweise das Waschen der Bakterien in destilliertem Wasser, das Auftrocknen auf den Film, das Vakuum und die Elektronenbestrahlung Membran und Kapsel ändern. Nach Fürst (14) wird durch mehrfaches Waschen in physiologischer Kochsalzlösung die Kapsel nicht angegriffen. Bei meinen Versuchen blieb bei Pneumokokken und besonders bei den Pneumobakterien auch beim Waschen mit destilliertem Wasser die Kapsel erhalten. Die Auftrocknung auf den Film kann keine anderen Veränderungen hervorrufen als im lichtoptischen Präparat, es entfällt zudem im übermikroskopischen Präparat die Fixierung. Veränderungen durch die Bestrahlung können auf dem Leuchtschirm sofort beobachtet werden, sie sind aber an der Kapsel von mir nicht gesehen worden, dagegen bei intensiver Bestrahlung an Nucleoiden, an den Granula der Tuberkelbazillen (24) und bei Untersuchungen über die bakteriophage Lyse (36). Die auch bei schwacher Bestrahlung eintretende Abtötung der Bakterien erfolgt ohne sichtbare Strukturänderungen.

Zu prüfen war noch der Einfluß des Hochvakuums auf Form, Größe und Lebensfähigkeit von Bakterien. Zunächst untersuchte ich das Verhalten von Bakterien, die nach der üblichen Methode in einer Aufschwemmung mit Aq. dest. auf einem Deckglas aufgetrocknet wurden. Das Deckglas wurde dreimal durch die Flamme gezogen und mit der Bakterienschicht nach dem Innenraum einer Hochvakuumkammer gewendet vakuumdicht aufgesetzt. Der Druck betrug nach dem Auspumpen in der Regel 2 mm Hg, in einzelnen Fällen wurden die Keime auch 10^{-5} mm Hg ausgesetzt. Die Vakuumkammer ist ähnlich der Feuchtkammer des Mikromanipulators so konstruiert, daß sie die lichtmikroskopische Beobachtung des Objektes während der Herstellung und Aufrechterhaltung des Vakuums bei hoher Vergrößerung ermöglicht. Während einer 5 Minuten andauernden Exponierung im Vakuum trat keine Aenderung der Größe oder der Form der Bakterien ein. Jetzt wurde derselbe Versuch mit unfixierten Bakterien wiederholt. Bei der Beobachtung während des Auspumpens war keine plötzliche Größenänderung zu sehen, mitunter schien mir jedoch eine ganz minimale nicht sicher meßbare Verkleinerung feststellbar. In keinem Falle jedoch war die

Schrumpfung größer, als sie bei der Fixierung in der Flamme eintritt. Es besteht umrißmäßig nach der Vakuumbehandlung kein sichtbarer Unterschied zwischen fixierten und unfixierten Bakterien.

Es war aber noch die Frage offen, ob bei den unfixierten, also noch lebenden Stämmen sich nicht Störungen in der Vermehrungsfähigkeit eingestellt hatten. Deshalb wurde auf die aufgetrockneten Bakterien nach der Vakuumbehandlung ein Tropfen steriler Nährbouillon aufgetragen und aus der Vakuumkammer eine feuchte Kammer hergestellt. Es zeigte sich danach ein absolut normales Wachstum des betreffenden Stammes. Bei der Sarcina tetragena war das Wachstum sogar nach sechsstündiger ununterbrochener Exponierung in der Vakuumskammer bei angeschlossener Pumpe noch erhalten. In einer anderen Versuchsfolge wurden Bakterienaufschwemmungen auf dünne Deckglas - Agarnährböden aufgetrocknet und für 5 bis 7 Stunden dem Vakuum ausgesetzt. Auch diese Kulturen gingen nachher in der feuchten Kammer an. Das Wachstum wurde lichtoptisch kontrolliert. Versuche, Bakterien in Nährbouillon aufzutrocknen und ebenso zu behandeln, ergaben das gleiche Resultat. Damit erscheint ein tiefgehender Einfluß der Vakuumbehandlung, d. h. der Trocknung und Entquellung nicht nur auf die Struktur, sondern auch auch auf die Lebensfähigkeit ausgeschlossen.

III. Die übermikroskopischen Aufnahmen.

Da die Pneumokokken, Pneumobakterien und Milzbrandbazillen auf den gewöhnlichen Nährböden selten typische Kapseln bilden, wurde ein Teil der folgenden Aufnahmen von Präparaten aus dem Tierkörper gewonnen.

a) Streptococcus lanceolatus.

Der Streptococcus lanceolatus bildet auf Blutagarplatten Diplokokken oder Streptokokken-Ketten, die untereinander nahezu gleiche Bilder ergeben, wenn sie aus derselben Kultur stammen. Auf Abb. I von Typ I erkennt man einen zentralen dunkleren Teil, der sich nach dem Rande zu etwas aufhellt. Er ist von einer schmalen, dunklen, membranartigen Schicht umgeben, die nach außen schärfer als nach innen begrenzt erscheint. Darauf folgt eine helle, breitere Zone, an deren Außenseite kleine Teilchen an-

gelagert sind. Diese Gliederung der Außenbegrenzung ist bei allen Kulturpneumokokken mit wechselnder Breite der einzelnen Zonen immer wieder zu finden. Diese membranartige Schicht läßt sich auch als Begrenzungslinie zwischen den zusammenstoßenden Diplokokkengruppen auf Abb. 2 von Typ III nachweisen. Man findet auch hier eine breitere Aufhellung zwischen dem zentralen Teil und der „Membran" und einen helleren Innenkörper. Diese Kontrastunterschiede können zum Teil vom Härtegrad des photographischen Abzuges abhängig sein, zum Teil sind sie durch die Bakterien selbst bedingt. Ich möchte darauf hinweisen, daß es sich hier nicht um Unterschiede handelt, die eine morphologische Unterscheidung der Typen ermöglichen. Zum Beispiel gibt die nächste Aufnahme denselben Typ III wieder, aber mit einem größeren Abstand zwischen Innenkörper und Membran. In anderen Fällen war dieser Abstand so gering, daß man ihn kaum nachweisen konnte. Die Aufnahme 4 vom Typ III zeigt eine körnig-flockige Anlagerung außerhalb der Membran. Die Begrenzung nach außen ist unscharf und zeigt einen allmählichen Uebergang zum strukturlosen Kollodiumfilm, auf dem die Bakterien liegen. Die lichtoptische Vergleichsaufnahme des gleichen Stammes (Abb. 5) läßt die Zellen mit einem hellen Hof erscheinen. Außerhalb des Hofes ziehen sich schleimige Substanzen hin. Sowohl licht- als auch elektronenoptisch ist die gleiche Lagerung um die Bakterien nachzuweisen. Der helle Hof erscheint lichtoptisch als eine in der Kultur gebildete „Kapsel", elektronenoptisch als eine Zone, in der die Schleimsubstanzen sehr wasserreich sind und daher nach dem Auftrocknen die Bakteriengruppe besonders locker umgeben. Bei anderen Stämmen findet man die körnig-flockigen Anlagerungen direkt dem Bakterienkörper aufliegen. Auch die aus Blut und Peritonealexsudat gewonnenen Pneumokokken zeigen ähnliche Substanzen auf der Zelloberfläche (Abb. 7). Der Zusammenhang zwischen den Kapselsubstanzen und der Bakterienzelle ist dabei sehr locker, scheint oft sogar völlig zu fehlen. Trotzdem haften die Substanzen nach dreimaligem Waschen noch an den Zellen fest. Entsprechende Versuche mit Pneumobakterien zeigten grundsätzlich ähnliche, jedoch noch deutlichere Bilder, so daß an der Zugehörigkeit der Substanzen zur Bakterienzelle nicht gezweifelt werden kann.

b) Bacterium pneumoniae.

Bei den Pneumobakterien aus Agarkulturen findet man eine mehrschichtige Außenbegrenzung, wie sie den Pneumokokken eigen ist, nicht. Die Zellen aus jungen Kulturen erscheinen scharf konturiert und häufig mit zentralen oder polaren Aufhellungen. In älteren Kulturen findet man daneben „Bakterienschatten" (Abb. 6) und körnige Formen. Nur selten ließen sich in Kulturen Bakterien finden, die eine den Pneumokokken ähnliche „Kapselbildung" zeigten. Demgegenüber findet man im Tierkörper eine andere Struktur der Bakterien. Die Zellen erscheinen untereinander gleichartiger und zeigen häufig einen oder während der Teilung zwei deutliche, durch ihre größere Dichte hervortretende Inhaltskörper (Abb. 8). Diese liegen diagonal zur Längsachse der Bakterien oder Doppelbakterien. Die Beziehungen zum Teilungsvorgang ermöglichen mit hoher Wahrscheinlichkeit, sie als „Nucleoide" (Piekarski) anzusprechen. Um den Bakterienkörper sieht man in größerer oder geringerer Breite die Kapselsubstanz (Abb. 11). Sie bricht wie bei den Pneumokokken nach außen unscharf ab. Die Anordnung der krümeligen Masse ist häufig radiär (Abb. 9). Es ist dies wohl eine Folge einer durch die Bakterienoberfläche erfolgenden allseitigen Abscheidung. Selbst wenn sie erst durch die Auftrocknung zustande kommen sollte, zeigt sie doch eine vorgebildete Lagerung und Ausrichtung der Kapselsubstanzen an. Mitunter sind in der Kapsel beträchtliche Lücken (Abb. 9). Hier erkennt man dann die Bakterienoberfläche scharf konturiert vorliegend, keineswegs gequollen und keinen allmählichen Uebergang zur Kapsel bildend. Hat man durch Waschen die Kapseln von den Bakterien abgelöst (Abb. 10), so erkennt man ebenfalls die scharfe Zellgrenze und darüber hinaus einen feinen „Strahlenkranz", wie er früher schon von Piekarski und Ruska (38 und 33, Abb. 9, 17b) bei Prodigiosusbakterien und Sarcina alba beschrieben wurde.

c) Bacillus anthracis.

Der Milzbrandbazillus zeigt als Sporenbildner in der Kultur eine davon abweichende Morphologie. Man sieht vor der Sporenbildung eine deutlich abgesetzte Membran um einen dichten Bakterienkörper liegen (Abb. 12). Der Abstand zwischen Membran und Innenkörper erinnert an die Abb. 3 der Pneumokokken. Beginnt jedoch die Ausbildung

der Sporen, so nimmt der Innenkörper an Dichte und Ausdehnung ab (Abb. 13). Werden schließlich die Sporen frei, so bleiben leere Membranen übrig (Abb. 14). Die Spore tritt dabei scheinbar durch eine polar liegende, manchmal klappenartige Oeffnung aus der Membran aus (Abb. 13). Es kann nun durch den Abstand zwischen Innenkörper und Membran eine Kapsel lichtoptisch vorgetäuscht werden. Diese sollte man jedoch erst im Tierkörper erwarten. Meine entsprechenden Versuche mit einem mäusepathogenen Milzbrandstamm haben jedoch immer nur gut begrenzte, kapsellose, meist homogen dichte Bakterienformen in Blut und Peritonealexsudat gezeigt. Es muß also durch die Waschprozedur die Kapselsubstanz entfernt worden sein, oder es fehlt dem Milzbrandbazillus entgegen den herrschenden Anschauungen die bei Pneumobakterien beschriebene echte Kapsel.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Die Untersuchungen an kapselbildenden Bakterien, und zwar an Kokken, nicht sporenbildenden und sporenbildenden Stäbchen haben es ermöglicht, strittige Fragen über den Feinbau dieser Keime zu klären und neuartige Befunde zu erheben. Im parasitierenden Zustand zeigen die Pneumobakterien in ihrem Cytoplasma wohl ausgebildete Nucleoide, deren Durchmesser 60 bis 160 mμ betragen. Sie sind also nur mittels der Uebermikroskopie genau nachweisbar. Die Einteilung des Bakteriencytoplasmas in Entoplasma und Ektoplasma (Zettnow) erscheint nicht streng durchführbar. Zwischen beiden ist eine scharfe Grenze (Schaudinn) nicht nachweisbar. Die Vorstellung, daß die ektektoplasmatische Zone dichter sei als das Entoplasma findet in den elektronenoptischen Bildern keine Stütze, dies gilt höchstens für die außerordentlich dünne Membran. An Dysenterie-, Bang-, Coli-, Paratyphus-, Prodigiosus-Bakterien wurde schon früher (7, 32, 33) gezeigt, daß die äußeren Cytoplasmateile häufig eine geringere Dichte aufwiesen als das Zellinnere. Die gleichen Befunde wurden zum Teil an Pneumokokken und Pneumobakterien (Abb. 3, 9 usw.) und mit großer Regelmäßigkeit an Milzbrandbazillen erhoben (Abb. 2, 13, 14). Während eine genaue Grenzziehung zwischen Entoplasma und Ektoplasma unmöglich

erscheint, ist die Begrenzung des Bakterienkörpers, d. h. des Ektoplasmas nach außen, immer scharf und erscheint häufig als konturartige Linie von etwa 8 bis 20 mμ Breite. Sie tritt besonders deutlich hervor, wenn zwischen dieser Linie und dem dichten Bakterieninnern ein breiterer, wenig massendichter Raum liegt. Wahrscheinlich handelt es sich bei manchen Bakterienformen dabei um Lücken, die durch Schrumpfung des Cytoplasmas zustande kommen. Die Beobachtungen sprechen jedenfalls für das Vorliegen einer Membran, deren Wandstärke so gering ist, daß sie der indirekten lichtoptischen Beobachtung entgehen mußte. Besonders erwiesen erscheint ihre Existenz, wenn aus der Umhüllungsmembran der Inhalt ausgetreten ist (Kruse spricht dann von Bakterienschatten, Abb. 13, 14). Gelegentlich beobachtet man sogar Faltungen in der Membran (Abbildung 13) (33, Abb. 13).

Außerhalb der Membran und damit außerhalb der Bakterien liegen häufig körnige Elemente, sogenannte Begleitkörper. Schleim erscheint meist als strukturloser Schleier um die Bakterienzelle. Die Kapselsubstanzen umgeben den Bakterienkörper teils als krümelige oder körnige Substanz, teils als Auflagerungen mit radiärer Struktur. Wir haben danach in der Kapselbildung lediglich Sonderfälle des allgemein verbreiteten Vorganges der Ausscheidung unlöslicher Substanzen vor uns. Es handelt sich dabei nicht um eine Quellung der äußeren Zellschicht (Binaghi, Gotschlich), diese liegt vielmehr völlig intakt unter der Kapsel vor (Abb. 9). Nach außen ist die Kapselbegrenzung unscharf und ohne Membran (Hinterberger, Hamm). Die Kapselbefunde mancher Autoren an Staphylo- und Streptokokken, Typhus-, Pest-, Coli- und Proteusbakterien dürften, sofern es sich nicht um Kunstprodukte durch die zum Teil sehr eingreifenden Darstellungsmethoden handelt, ebenfalls bakterielle Ausscheidungen sein. Der wesentliche Unterschied zwischen dem Schleim und der Kapsel liegt darin, daß die Schleimsubstanzen zwischen den Bakteriengruppen zusammenfließen, während echte Kapseln (Abb. 11) die einzelnen Bakterien oder Diplokokken isoliert umgeben.

Beim Milzbrandbazillus konnte ich keine echte Kapsel nachweisen. Damit nähern sich meine Befunde der Auffassung von A. Fischer (13) und W. Enderle, die auch das Vorhandensein einer Kapsel bei den Pneumobakterien

bestreiten, was ich jedoch ablehnen muß. Im ungefärbten Präparat kann lichtoptisch der Eindruck einer Kapsel bei echter Kapselbildung entstehen, aber auch, wenn sich Lücken im Ausstrichmaterial um die Bakterienzelle bilden. Dabei ist zu beachten, daß solche Lücken sowohl zwischen der Bakterienmembran und der Umgebung als auch innerhalb der Membran (Milzbrand) zwischen dieser und dem Cytoplasma vorkommen können. Die unmittelbare Abbildung der durchstrahlten Masse durch das übermikroskopische Verfahren schließt Täuschungen über das Vorhnadensein oder Fehlen einer Kapselsubstanz aus.

V. Zusammenfassung.

Die bisherigen Beobachtungen über die allgemeine Morphologie der Bakterien werden mit dem Siemens-Uebermikroskop nach E. Ruska und B. v. Borries an kapselbildenden Bakterien erweitert.

Der Einfluß des Untersuchungsverfahrens auf Struktur und Lebensfähigkeit der Bakterien wird geprüft.

Die Deutung der gewonnenen Bilder erfolgt unter besonderer Berücksichtigung der Frage nach der Existenz und Struktur von Bakterienmembran und Kapsel.

An Pneumokokken läßt sich Kapsel oder Schleimsubstanz und Membran getrennt darstellen.

Die Pneumobakterien zeigen in parasitierendem Zustand außer Membran und Kapsel deutliche Inhaltskörper, die als Nucleoide angesprochen werden Die Kapseln zeigen eine radiäre Ordnung ihres Aufbaues. In der Kultur gewonnene Pneumobakterien zeigen keine Nucleoide.

Bei den Milzbrandbazillen ist die Membran in besonders schöner Ausbildung nachweisbar. Nach der Sporenreifung tritt die Spore durch eine polare Lücke in der Membran aus der Zelle aus. Kapseln sind bei Milzbrandbazillen nicht nachzuweisen gewesen.

Die Kapsel erscheint als Ausscheidungsprodukt des Bakteriums. Sie ist keine Aufquellung der äußeren Bakterienschicht. Diese läßt sich vielmehr völlig intakt unter der Kapsel nachweisen.

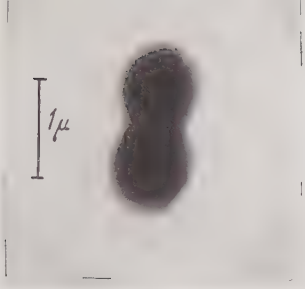


Abb.1 II/516/39

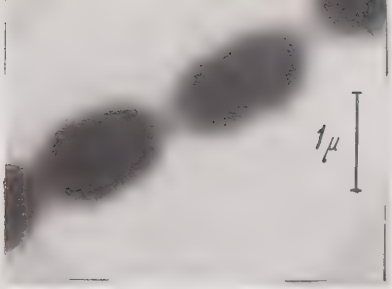


Abb.2 II/541/39

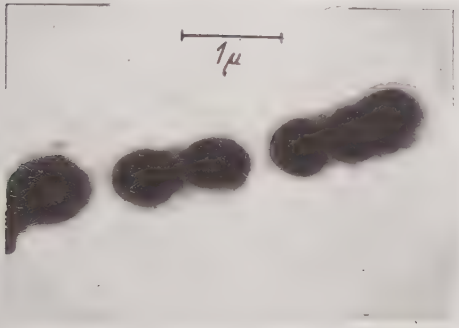


Abb.3 II/514/39

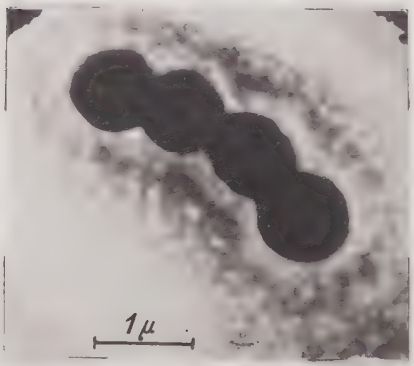


Abb.4 II/512/39

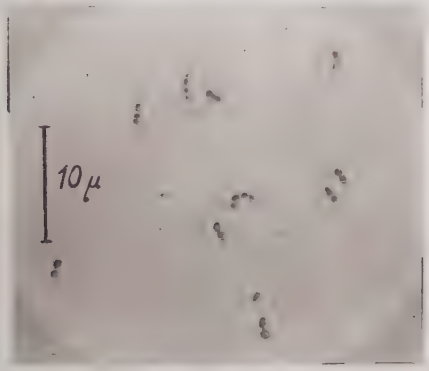


Abb.5 7o

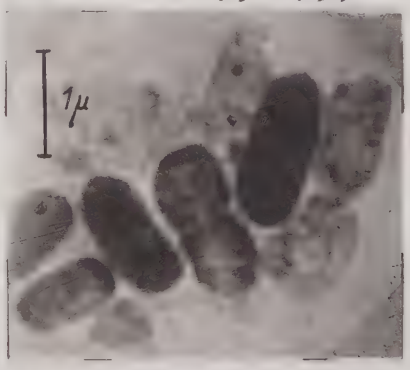
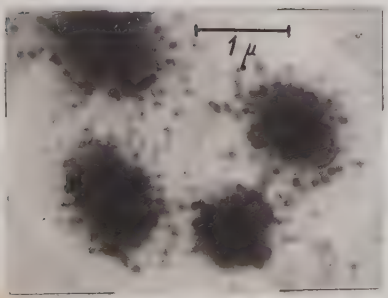


Abb.6 II/6o5/39



b.7 II/872/39

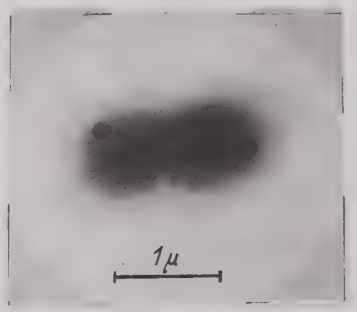


Abb.8 II/817/39

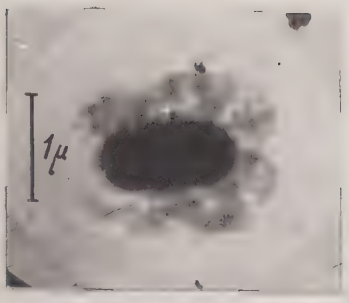


Abb.9 II/829/39

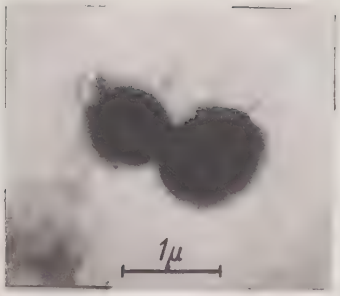


Abb.1o II/825/39

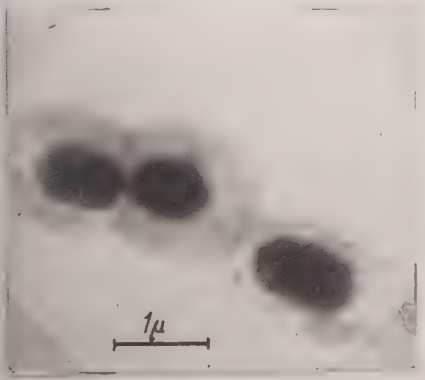


Abb.11 II/819/39

Abb.12 II/1oo/4o

Abb.13 II/98/4o

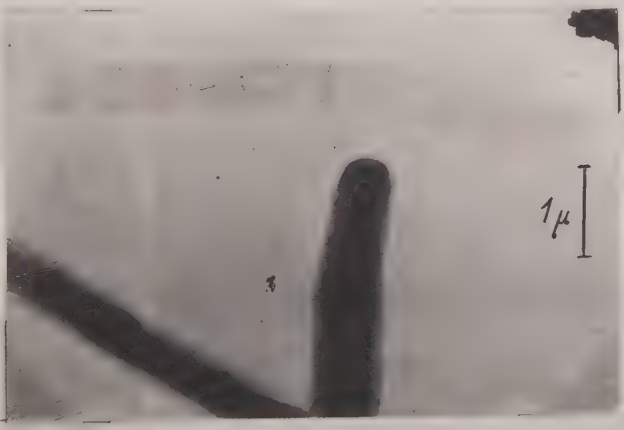


Abb.14 II/95/4o

Für die Anregung zu dieser Arbeit und freundliche Ratschläge möchte ich Herrn Dr. med. H. Ruska, für die zu ihrer Durchführung notwendige Bereitstellung eines Uebermikroskopes den Herren Dr.-Ing. E. Ruska und Dr.-Ing. B. v. Borries vom Laboratorium für Elektronenoptik Siemens & Halske AG. meinen Dank sagen. Für die Ueberlassung von Bakterienstämmen bin ich dem Bakteriologischen Laboratorium des Rudolf-Virchow-Krankenhauses (Prof. Dr. T. Wohlfeil) und dem Hygienischen Institut der Universität Berlin (Dr. A. Vierthaler) zu großem Dank verpflichtet.

Erklärung zur Bildertafel.

Abb. 1: Streptococcus lanceolatus, Typ I, 24stündige Kultur auf Blutagarplatte, el. opt. 13000 : 1.

Abb. 2: Streptococcus lanceolatus, Typ III, 18stündige Kultur auf Blutagarplatte, el. opt. 13000 : 1.

Abb. 3: Streptococcus lanceolatus, Typ III, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte, el. opt. 13000 : 1.

Abb. 4: Streptococcus lanceolatus, Typ III, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte, el. opt. 13000 : 1.

Abb. 5: Streptococcus lanceolatus, Typ III, 72stündige Kultur auf Blutagar, gefärbt mit alkohol.-wässrigem Fuchsin, lichtopt. 15000 : 1.

Abb. 6: Bacterium pneumoniae, 12 Tage alte Agarkultur, el. opt. 14000 : 1.

Abb. 7: Streptococus lanceolatus, Typ II, aus Peritoneal-Exsudat isoliert, el. opt. 12000 : 1.

Abb. 8: Bacterium pneumoniae, aus Mäuseblut isoliert, el. opt. 14000 : 1.

Abb. 9: Bacterium pneumoniae, aus Mäuseblut isoliert, el. opt. 14000 : 1.

Abb. 10: Bacterium pneumoniae, aus Peritonealexsudat isoliert, el. opt. 13 000 : 1.

Abb. 11: Bacterium pneumoniae, aus Mäuseblut isoliert, el. opt. 12000 : 1.

Abb. 12: Bacillus anthracis, 28 Tage alte Agarkultur, el. opt. 12000 : 1.

Abb. 13: Bacillus anthracis, 30 Tage alte Agarkultur, el. opt. 12000 : 1.

Abb. 14: Bacillus anthracis, 30 Tage alte Agarkultur, el. opt .12000 : 1.

Literatur.

1. Babes, V.: Zeitschr. f. Hyg., 9, 323, 1890; **20,** 420, 1895.
2. Babes, V.: C. r. Soc. Biol. Paris **68,** 315, 1910.
3. Bail, O.: Handb. d. mikrobiol. Techn. II, S. 1152, 1923; Verlag Urban-Schwarzenberg.
4. Baumgärtel, T.: Grundr. d. theor. Bakteriol., S. 9, Bln., Springer.
5. Bergel, S.: Beitr. z. Klin. d. Tuberkul., **38,** 95, 1917.
6. Binaghi, R.: Centralbl. f. Bakt. II, **4,** 897, 1898.
7. v. Borries, B., E. und H. Ruska: Klin. Wochenschr. **17,** 921, 1938.
8. v. Borries, B. und E. Ruska: Naturwiss. **27,** 281, 1939.
9. v. Borries, B. und E. Ruska: Zeitschr. wiss. Mikroskopie **56,** 317, 1939, und Naturwissenschaft **27,** 577, 1939.
10. Bunge, R.: Fortschr. d. Med. **12,** 462, 1894.
11. Emmerich, R., und Dr. Saida: Centralbl. f. Bakt. I, **27,** 776, 1900.
12. Enderle, W.: Hat der Milzbrand eine Kapsel?. Inaug.-Diss. Tübingen 1911.
13. Fischer, A.: Vorlesungen über Bakterien, Jena, G. Fischer 1903.
14. Fürst, Th.: Centralbl. f. Bakt. I, **56,** 97, 1910.
15. Gotschlich, E.: Handb. d. path. Mikroorg. I, 75, 1929.
16. Gutstein, M.: Centralbl. f. Bakt. I, **93,** 233, 1924.
17. Hamm, A.: Centralbl. f. Bakt. I, **43,** 287, 1907; **46,** 1, 1908.
18. Heim, L.: Arb. a. d. Kaiserl. Ges. Amt. 5, 520.
19. Heim, L.: Arch. f. Hyg. **40,** 55, 1901 und Münch. med. Wochenschr. Nr. 10, 1904.
20. Hinterberger, A.: Centralbl. f. Bakt. I, **30,** 424, 1901; **45,** 108, 1908.
21. Jone: Deutsche Zeitschr. f. Tiermed., 19, 244.
22. Knoll, W.: Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **15,** 211, 1910.
23. Kruse, W.: In Flügge, Mikroorganismen I, 70, 1896.
24. Lembke, A.: H. Ruska und J. Christophersen: Klinische Wochenschrift **19,** 217, 1940.
25. Meyer, A.: Zitiert nach Heim, Lehrbuch d. Bakt. 198, 1922.
26. Migula, W.: Deutsche tierärztl. Wochenschr., S. 28, 1896 und System der Bakterien, S. 125, Jena, G. Fischer, 1900.
27. Müller, R.: Medizinische Mikrobiologie, Verlag Lehmann 1939.
28. Nakanishi, K.: Münch. med. Wochenschr., S. 187, 1900.
29. Noetzel, W.: Fortschr. d. Med., **14,** 41, 1896.
30. Ottolenghi, D.: Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **9,** 769, 1911.
31. Pane, N.: Centralbl. f. Bakt. I, **58,** 570, 1911.
32. Piekarski, G. und H. Ruska: Klin. Wochenschr. **18,** 383, 1939.
33. Piekarski, G. und H. Ruska: Arch .f. Mikrobiol. **10,** 302, 1939.

34. Pietschmann, K. und A. Rippel: Arch. f. Mikrobiol. **3**, 422, 1932.
35. Ruska, H.: Naturwiss. **27**, 287, 1939.
36. Ruska, H.: Naturwiss. **28**, 45, 1940.
37. Ruska, H. und E. Frühbrodt: Der Biologe, **9**, 69, 1940.
38. Ruska, H.: Verhandl. d. Dtsch. Zoolog. Gesellsch. 1939, S. 295.
39. Sauerbeck, E: Centralbl. f. Bakt. I, **50**, 572, 1909. Zeitschr. f. Hyg. **56**, Nr. 9, 1909.
40. Schaudinn, F.: Arch. f. Protistenkunde **1**, 314, 1902; **2**, 416, 1903.
41. Toeniessen, E.: Centralbl. f. Bakt. I, **65**, 23, 1911.
42. Unna, P. G.: Centralbl. f. Bakt. I, **3**, 97, 1888.
43. Wohlfeil, T.: In C. Flügges Grundr. d. Hyg., S. 586, 11. Aufl., 1940.
44. Wolochin, A. D.: Centralbl. f. Bakt. I, **72**, 312, 1914.
45. Zettnow, E.: Zeitschr. f. Hyg. **24**, 74, 1897.
46. Zettnow, E.: Zeitschr. f. Hyg. **21**, 165, 1896; **86**, 25, 1915.

Lebenslauf.

Ich wurde als Sohn des Fachvorstehers Reinhold Frühbrodt und seiner Ehefrau Erna geb. Just am 26. Dezember 1913 zu Fahrenwalde, Krs. Prenzlau, geboren und auf die Namen Eckehard Ewald Reinhold evangelisch getauft. Nach dem Besuch der 257. Gemeindeschule in Berlin trat ich in das Günther-Roß-Realgymnasium zu Berlin-Weißensee ein und absolvierte dort 1933 mein Abitur mit Gut. Während der letzten drei Jahre beschäftigte ich mich dort mit Fragen der Bakteriologie. Nach der halbjährigen Arbeitsdienstzeit begann ich im Wintersemester 1933/36 mein Medizinstudium an der Universität Berlin. In den Semesterferien leistete ich 1 Monat Krankenpflegedienst, 4 Monate Famulatur Innere Medizin ab und war 3 Monate als Hauspraktikant an der Geburtshilflichen Poliklinik tätig. Nach 10semestrigem Studium an der Universität Berlin stehe ich hier nunmehr im Staatsexamen.